

論 説

花粉の生化学的研究 XVI*

アカマツ花粉のプロテイナーゼについて

勝又悌三**・江尻慎一郎**・大久保陽一***

Biochemical studies on pollen XVI*

Proteinase in the pollen of *pinus densiflora*

Teizo KATSUMATA**, Shin-ichiro EJIRI**and Yōichi ŌKUBO***

緒 言

花粉の生化学的研究の一部として、花粉発芽生理の酵素化学的研究を行なっているが、糖質代謝関連酵素としてはアミラーゼ、インベルターゼ、マルターゼ(アカマツ花粉のみ)、ヘキシキナーゼ、ホスホリラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼなどが発芽時に活性を増大することを認めた⁽¹⁻⁴⁾。またアカマツ花粉に4種類のリボヌクレアーゼ(RNase 1, 2, 3, 4)を確認し、表在酵素と考えられるRNase 4が発芽時に活性を増大することを認めた⁽⁵⁾。ついでアカマツ花粉のプロテイナーゼについて検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 試 料

アカマツ(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.)花粉は前報⁽⁶⁾に準じ、また発芽花粉は特記しない限り前報⁽¹⁾に準じてそれぞれ調製し、試料とした。

2. 酵素液の調製

上記花粉をSSA半融アルミナ製乳鉢で石英砂を少量加えてよく磨砕し、20倍量の抽出溶媒〔蒸溜水(以下水と略記)およびpH7.0の0.1Mリン酸緩衝液、クエン酸-Na₂HPO₄緩衝液など〕を加え、1時間攪拌後遠心分離(8,500 g、10分間、以下遠心分離はすべて5℃以下)し、上清液を粗酵素液とした。

* 著者らはこの論文を謹んで斗ヶ沢宣久博士の御霊前に捧げます。

** 〒020 盛岡市上田三丁目18番8号 岩手大学農学部農芸化学科

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, Iwate, Japan

*** 〒116 東京都荒川区荒川6の2の4 荒川保健所

Arakawa Government Office of Public Health, Arakawa, Tokyo, Japan

3. 酵素活性の測定

Anson 法⁽⁷⁾に基づく萩原の Folin 変法⁽⁸⁾を用いて行なった。酵素液を適宜希釈し、下記の方法で酵素活性を測定し、酵素量と基質の分解量が直線関係を示すような酵素液を活性測定に用いた。

(1) 酸性プロテイナーゼ：酵素液 1 ml に 1% ヘモグロビン（和光特級牛血清ヘモグロビン）溶液〔0.1 M クエン酸- Na_2HPO_4 緩衝液 (pH3.0) に溶解〕1 ml を加えて 40°C、30 分間反応後、除タンパク剤（0.4 M トリクロル酢酸水溶液⁽⁹⁾）2 ml を加えて未分解のタンパク質を沈澱させ、東洋濾紙 No. 2 で濾過後、濾液 1 ml に 0.4 M 炭酸ナトリウム 5 ml を加えた後 Folin 試薬 1 ml を加えて 40°C で 20 分間発色させ、島津 Q V 50 型光電分光光度計を用い 670 nm で吸光度を測定して酵素活性とした。なお対照試験（除タンパク剤を加えた後基質溶液を加える）も同時に行ない吸光度を補正した。

(2) 中性プロテイナーゼ：基質として 2% カゼイン（Merck 製 Hammarsten カゼイン）溶液〔0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.5) に溶解〕を用い、除タンパク剤として 0.1 M トリクロル酢酸、0.2 M 酢酸ナトリウム、0.3 M 酢酸混合水溶液⁽⁸⁾を用いる以外はすべて酸性プロテイナーゼの場合に準じて行なった。

4. 酵素の精製

(1) 硫酸塩析：粗酵素液各々 10 ml に所要量の硫酸を加え 2% アンモニア液で pH7.0 に調整し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.0) で 15 ml にして低温下 5 時間放置後遠心分離（8,500 g、10 分間）し、各沈殿をそれぞれの飽和度の硫酸溶液で 1 回洗浄後 0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.5) に溶解して酵素活性を測定した結果、0.3~0.7 飽和（Osborne 飽和度）で両プロテイナーゼの大部分が塩析されることが解ったので、あらためて 0.3~0.7 飽和沈澱画分を調製し、0.01 M リン酸緩衝液 (pH7.0) 30ml に溶解後セロファンチューブに入れ、同緩衝液に対して一夜透析した。

(2) DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー：DEAE セルロース（Brown 社製）を賦活化⁽¹⁰⁾してからカラム（1.8×28 cm）を作り、0.01 M リン酸緩衝液 (pH7.0) で平衡化後前述の透析酵素液 36 ml を注加し、100ml の同緩衝液で非吸着部を溶出させた後、0.5 M 食塩を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH7.0) 250ml と食塩を含まない同容の同緩衝液による直線的食塩濃度勾配法で 0.3g/分 の速度で溶出させ、5 g ずつフラクションコレクター（東洋科学産業 KK SF-160 型）で分取した。

5. 酵素の性質

(1) 最適 pH と最適温度：Fig. 1 に示した緩衝液を用いて基質を調製して最適 pH を検討し、また反応温度を 20°~80°C の範囲で変えて最適温度を検討した。

(2) pH 安定性と熱安定性：酵素液 0.5 ml に 0.02 M クエン酸- Na_2HPO_4 緩衝液 (pH 3.0~7.0) または 0.02 M ホウ酸ナトリウム- KH_2PO_4 緩衝液 (pH 8.0~9.0) 0.5ml を加え、各 pH で 5°C、24 時間放置後酵素活性を測定し、対照試験（pH 7.0、5°C 放置）の酵素活性に対する各 pH における酵素活性の残存率を算出して pH 安定性を検討し、また酵素液を 30°~80°C の水浴中でそれぞれ 10 分間加熱した後水中で急冷し酵素活性を測定し、加熱処理をしない酵素液を用いた対照試験も同時に行ない、各温度における酵素活性の残存率を算出して熱安定性を検討した。

(3) 金属イオンその他試薬の影響：酵素液 0.5 ml に最終濃度がおよそ 10^{-3}M になるように調製した塩類およびその他の試薬（Table 2 参照）0.5 ml を添加後酵素活性を測定し、対照試験も同時に行ない酵素活性の残存率を算出した。

結果および考察

花粉のプロテアーゼに関しては、古くは Kamman⁽¹¹⁾ がライムギ花粉中にプロテアーゼ活性を認め、また Paton⁽¹²⁾ がトウモロコシ、アキノキリンソ

ウ、モクレン、オーストリアマツ、ブタフサ、ライムギ、チモシーなどの花粉中にトリプシン様活性をまたトウモロコシ、チモシー、モクレンなどの花粉中にペプシン様活性を認めている。その後の花粉プロテアーゼに関する研究は少ないが、Makinen ら⁽¹³⁾はマツヨイグサ花粉を 1% 食塩水に懸濁するとロイシンアミノペプチダーゼが溶出すること、Nevryanskaya ら⁽¹⁴⁾はトウモロコシ花粉にプロテアーゼ活性があること、Simeonova ら⁽¹⁵⁾はヒマワリ花粉を野外（2～3 日）または冷所（30～60 日）に貯蔵するとプロテアーゼ活性が減少すること、Hara ら⁽¹⁶⁾がソテツ花粉中に表在性プロテアーゼが存在することなどを報告している。

以上のように花粉プロテアーゼに関する詳細な研究はほとんどないので、著者らはまずアカマツ花粉のプロテイナーゼについて検討した。

はじめにプロテイナーゼ活性測定の予備実験として、粗酵素液を用いて酵素活性と pH、温度、抽出溶媒、抽出時間などの関係を検討した。水 1 時間抽出粗酵素液のプロテイナーゼ活性と pH の関係を試験した結果 (Fig. 1)、完熟、発芽花粉とも pH3.0 と

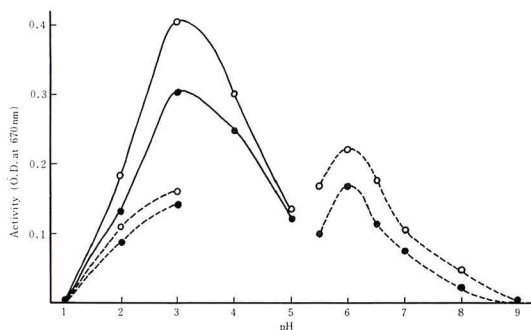


Fig. 1

pH6.0 附近に最適 pH が認められたが、pH8.0 以上ではほとんど活性を示さなかった。アカマツ花粉中には最適 pH3.0 附近の酸性プロテイナーゼ（以下 AP と略記）と最適 pH6.0 附近の中性プロテイナーゼ（以下 NP と略記）の存在が考えられるので、以後の実験は pH3.0 と pH6.5（pH6.0 が望ましいがカ

ゼインの溶解性があまりよくないので、透明に溶解する pH6.5 を選んだ）で活性を測定することにした。なお基質濃度はヘモグロビンは 1%、カゼインは 2% が充分量であることを確かめた。プロテイナーゼ活性と温度の関係 (Fig. 2) は、完熟、発芽花

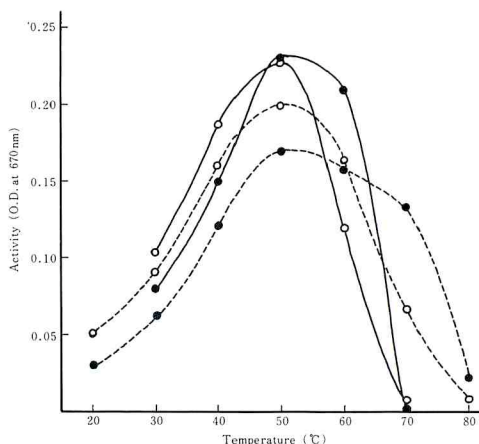


Fig. 2

粉の両酵素とも 50°C に最適温度を示した。以後の実験は熱安定性も考慮して〔粗酵素の場合 50°C の加熱処理で完熟、発芽花粉の両酵素はそれぞれ約 10%（完熟 AP、NP）、25%（発芽 AP）、45%（発芽 NP）失活した〕40°C で行なうことにした。予備実験で両酵素とも pH 5.0～7.0 で安定であることを認めたので、pH7.0 の前述の抽出溶媒を用い酵素の抽出を検討した結果、リン酸緩衝液がよかったので以後の実験には 0.1 M リン酸緩衝液を用いることにした。また同緩衝液について両酵素とも 1～1.5 時間抽出でほとんど活性の差が認められなかったので 1 時間抽出を採用した。

つぎに発芽条件とプロテイナーゼ活性の関係を検討した結果、培地の最適 pH は 6.5（18 時間で発芽率 90%、発芽率は前報⁽¹⁾に準じて算定した）、最適温度は 30°C であったので以後の発芽実験は pH6.5、30°C で行なった。プロテイナーゼ活性と発芽時間の関係を検討した結果 (Fig. 3)、無糖培地の場合両酵素とも 18 時間で約 1.3 倍の活性増大を示したが、24 時間では活性低下がみられた。ショ糖培地の場合 18

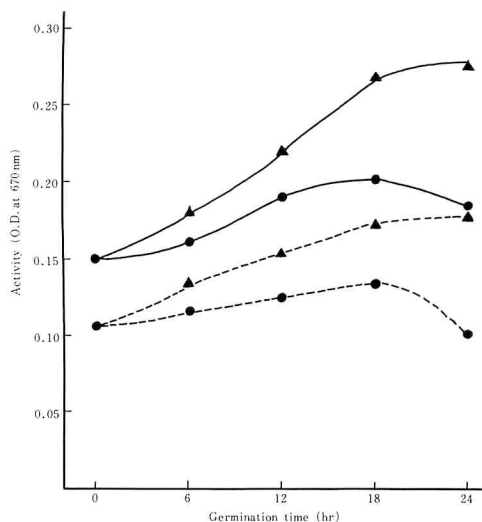


Fig. 3

時間で AP は 1.8 倍、NP は 1.7 倍の活性増大を示し、24 時間でも若干活性が増大している。Tanaka⁽¹⁷⁾は糖を添加すればアカマツ花粉は長時間にわたって花粉管伸長をつづけることを報告しており、ショ糖は管伸長のためのエネルギー源となるとともに、酵素の活性増大にも消費されているようである。18 時間以上経過するとカビなどの繁殖がはじまるので、以後 3% ショ糖—3% 寒天 (pH 6.5) で 30°C、12 時間発芽のものを使用した。エゾスカシユリ花粉にとってアミノ酸(とくにグルタミン酸、アスパラギン酸)が発芽の必須要素であることが知られているので⁽¹⁸⁾、アカマツ花粉発芽時のアミノ酸添加とプロテイナーゼ活性との関係を検討した (Table 1)。はじめにアスパラギン酸とグルタミン酸の

Table 1. Effect of amino acid on the germination and the activity of proteinase.

Amino acid added (10 ⁻² M)	Germination (%)	Relative activity (%)	
		Acid proteinase	Neutral proteinase
None	85	100	100
Glutamic acid	55	125	118
Aspartic acid	80	148	150
Glycine	40	100	100
Alanine	70	125	130
Arginine	70	126	131
Lysine	40	110	120
Histidine	65	130	148
Phenylalanine	15	105	114
Methionine	75	104	109
Cysteine	10	—	—

The germination was carried out on 3% sucrose-3% agar (pH 6.5) for 12 hr at 30°C, and the activities were measured same as in Fig. 3.

添加量 (0.1 M、0.05 M、0.01 M、0.005 M) を検討したところ、0.01 M がよかったのですべてこの濃度を用いた。アスパラギン酸以外は発芽率の低下を示し、とくに芳香族のフェニルアラニンと含硫アミ

ノ酸のシステインは発芽を抑制した。発芽率とは逆に AP の場合はグリシン、フェニルアラニン、メチオニン以外は 10~48% の活性増大、NP の場合はグリシン以外 9~50% の活性増大を示した。これらア

ミノ酸による活性増大機構は後日検討したいと考えている。

今までの研究でショ糖一寒天培地での発芽時に、プロテイナーゼ活性が1.7~1.8倍増大することを認めたので、完熟、発芽花粉のAPおよびNPを部分精製してその性質を比較検討した。硫酸0.3~0.7飽和画分のDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーの結果をFigs. 4, 5に示した。完熟花粉の場合(Fig. 4)、APについては3つのピーク(溶出食塩濃

度0.01~0.05 M、0.15 M、0.28 M)が得られたが、溶出順に従ってAP₁(フラクション No……以下Noと略記……44~53)、AP₂(小さいピークで以後検討できなかった)、AP₃(No 88~105)とする。NPについても3つのピーク(溶出食塩濃度0.01~0.03 M、0.18 M、0.28 M)が得られたが、溶出順に従ってNP₁(No 44~53)、NP₂(以後検討しなかった)、NP₃(No 88~105)とする。発芽花粉の場合(Fig. 5)、APについては4つのピーク(溶出食塩濃度

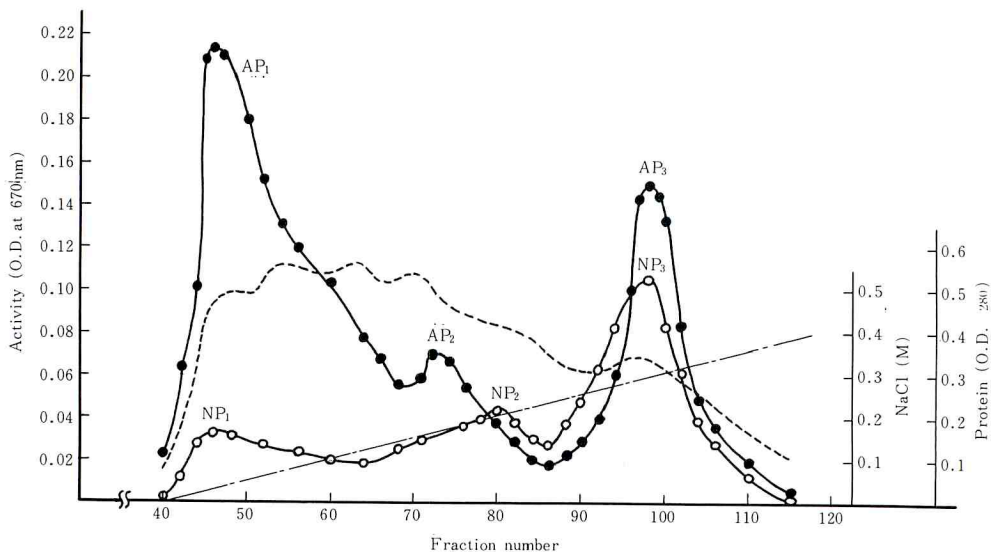


Fig. 4

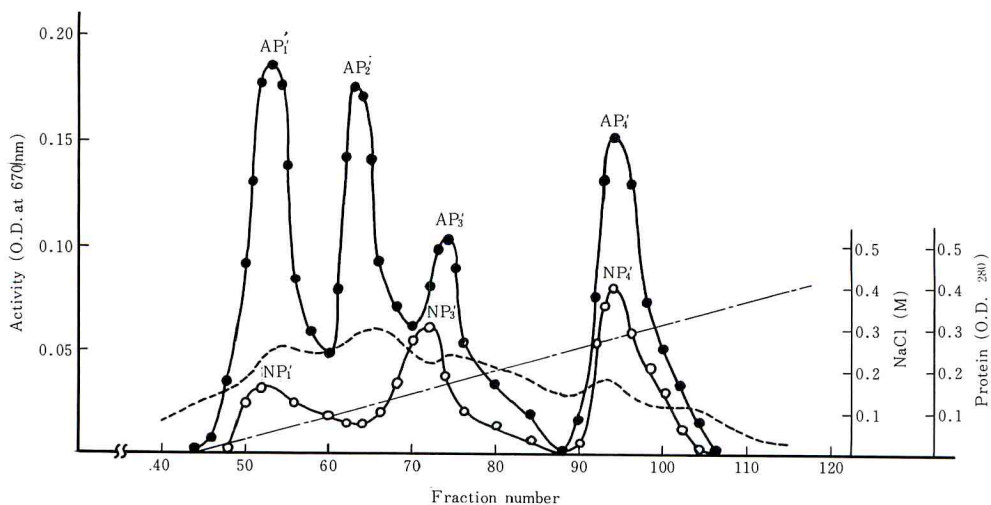


Fig. 5

0.05 M、0.10 M、0.15 M、0.28 M) が得られたが、溶出順に従って AP'_1 (No 48~58)、 AP'_2 (No 61~67)、 AP'_3 (No 68~74)、 AP'_4 (No 90~100) とする。NP については3つのピーク (溶出食塩濃度 0.02~0.05 M、0.15 M、0.28 M) が得られたが、溶出順に従って NP'_1 (No 48~58、以後検討しなかった)、 NP'_3 (No 68~74)、 NP'_4 (No 90~100) とする。完熟、発芽花粉の溶出パターンを比較すると、AP については食塩濃度 0.20 M までに前者では大きなピークが1つしか出ないのに、後者では明瞭な3つのピークが認められること、NP については前者では 0.18 M 附近にピーク (NP_2) がみられ、後者では 0.15 M 附近に比較的大きなピーク (NP'_3) が認められることなどが相違しており、一方 0.05 M 附近および 0.28 M 附近の AP、NP の溶出パターンは類似し

ている。また両花粉とも非吸着部分に一部の AP および NP が検出されたが、これらについては今後検討する予定である。

以下 DEAE セルロースによる分画酵素について性質を検討した。活性と pH の関係を検討した結果 (Fig. 6)、最適 pH は AP_1 、 AP'_1 、 AP'_2 、 AP'_3 ではす

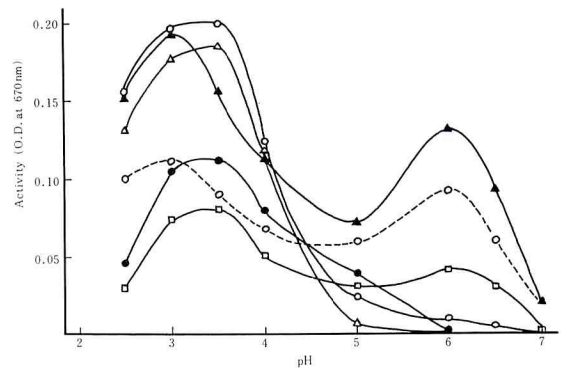


Fig. 6

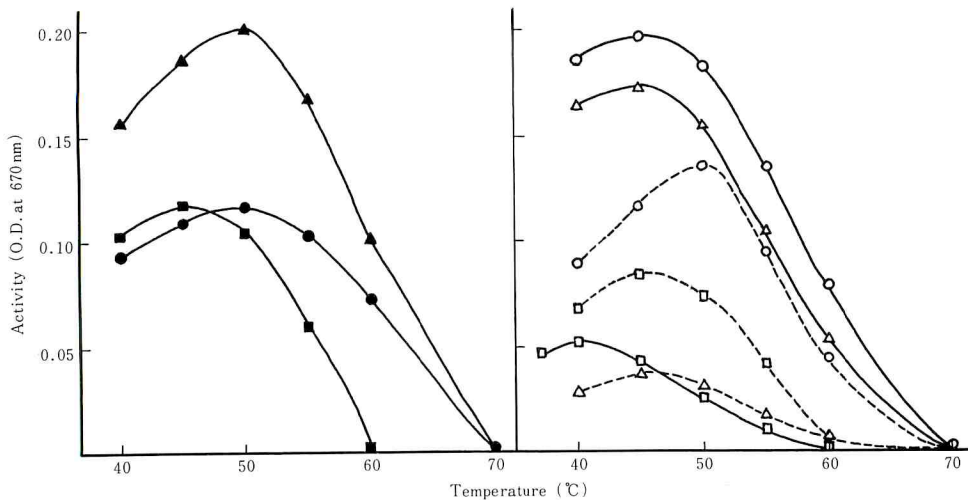


Fig. 7

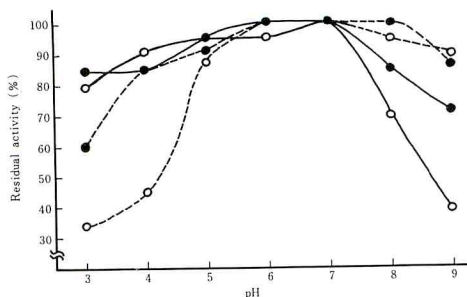


Fig. 8

べて 3.5、 AP_3 、 AP'_4 では 3.0、 NP_3 、 NP'_3 、 NP'_4 ではすべて 6.0 であった。活性と温度の関係を検討した結果 (Fig. 7)、最適温度は AP_1 、 AP_3 、 AP'_4 では 50 °C、発芽花粉に新たに現われた AP'_3 では 40 °C でその他はすべて 45 °C であった。pH 安定性を検討した結果 (Fig. 8)、完熟花粉の AP_3 は酸性側で安定で、とくに pH 5.0~7.0 で安定であるがアルカリ側では不安定となり、 NP_3 は逆にアルカリ側で安定でとくに pH 6.0~8.0 で安定であるが pH 3.0 ではかなり失

活する。発芽花粉の AP'_4 も酸性側で安定でとくに pH 5.0~7.0 で安定であるがアルカリ側での失活が完熟花粉の場合より著しく、 NP'_4 は逆にアルカリ側で安定でとくに pH 6.0~8.0 で安定であるが酸性側での失活が完熟花粉の場合より著しい。以上の傾向は両花粉の他の AP 、 NP にもほぼ同様に観察された。熱安定性を検討した結果 (Fig. 9)、 AP_3 、 NP_3 は 60°C から明らかな失活をはじめ 80°C で完全に失活し、 AP_4 、 NP_4 は 45°C から明らかな失活をはじめ 70°C で完全に失活する。以上の傾向は両花粉の他の AP 、 NP にもほぼ同様に観察され、発芽花粉プロテイナーゼの方が熱安定性が低い。次に各種試薬と酵素活性の関係を検討した結果 (Table 2)、 Mn^{2+} は AP に対して 36~160%の活性増大を示し、 Cu^{2+} は

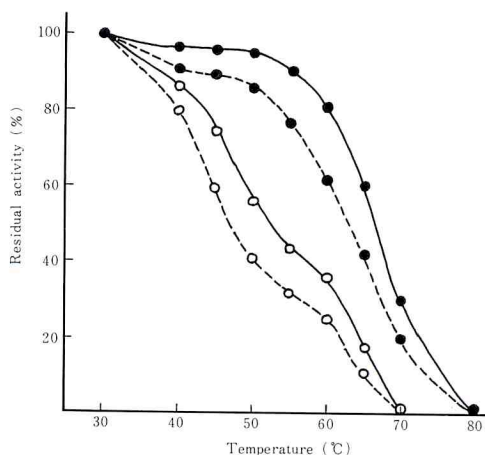


Fig. 9

Table 2. Effects of some metal ions and reagents on the activity of fractionated proteinase.

Reagents (10^{-3}M)	Relative activity (%)								
	Matured pollen			Germinated pollen					
	AP_1	AP_3	NP_3	AP'_1	AP'_2	AP'_3	AP'_4	NP'_3	NP'_4
None	100	100	100	100	100	100	100	100	100
HgCl_2	29	89	20	41	65	85	76	72	81
FeCl_2	100	88	108	98	91	106	98	89	102
CuSO_4	118	110	66	92	94	110	108	57	20
$\text{Pb}(\text{OAc})_2$	105	94	100	94	91	99	88	100	104
ZnCl_2	100	96	130	95	102	121	97	98	101
MnCl_2	217	136	78	155	175	150	260	100	102
MgCl_2	107	101	100	104	102	115	86	98	91
BaCl_2	98	99	85	92	95	89	98	89	100
CaCl_2	108	100	91	95	97	93	95	98	102
EDTA	96	100	88	95	93	91	71	85	105
o-Phenanthroline	95	100	78	93	93	91	91	96	91
PCMB	71	91	98	91	85	91	90	88	92
CH_2ICOOH	86	82	87	91	88	91	94	92	92
KCN	102	100	70	98	93	104	84	90	85

The activities were measured same as in Fig. 8. Abbreviations were shown in Figs. 4 and 5.

一部の AP (AP_1 , AP_3 , AP_5) に対して若干の活性増大 (10~18%) を示した。Zn²⁺は NP_3 、 AP_3 に対し、Mg²⁺は AP_3 に対して活性増大 (それぞれ 30%、21%、15%) を示した。Hg²⁺は阻害程度は異なるがほとんどの酵素活性を阻害し、Cu²⁺は NP 活性のみを阻害した。またすべての酵素について EDTA、 α -フェナンスロリン、PCMB、モノヨード酢酸、シアン化カリウムによる阻害作用はほとんどみられず、アカマツ花粉のプロテイナーゼはすべて金属酵素ではなく、また植物プロテイナーゼにしばしばみられる SH 酵素⁽¹⁹⁾でもないと思われる。

部分精製酵素ではあるが、これらの分画酵素は最適 pH、最適温度、金属イオンによる影響などに若干の相違が認められ、アイソザイムの可能性がある。アカマツ花粉の RNase アイソザイムが発芽時にその活性を変動することを報告したが⁽⁵⁾、プロテイナーゼについては明らかな発芽時の溶出パターンの変化 (Figs. 4,5) を認めたことは興味ある点である。当研究室では、アカマツ花粉の無細胞タンパク質合成系を確立したので⁽²⁰⁾、今後この系を活用して緒言で述べた緒酵素や、これらプロテイナーゼの発芽時の活性増大機構を追究したいと考えている。

要 約

アカマツ花粉を用い、プロテイナーゼの発芽時の活性変化を調べ、ついで完熟および発芽花粉の DEAE セルロースによる分画酵素の性質を比較検討し次の結果を得た。

- (1) 完熟および発芽花粉の粗酵素を用いた実験

で、いずれにも最適 pH 3.0 と 6.0 附近の 2 種類のプロテイナーゼ〔前者を酸性プロテイナーゼ (AP)、後者を中性プロテイナーゼ (NP) と記す〕が存在することを確認した。

- (2) ショ糖培地での発芽時 (18 時間) に AP 活性は 1.8 倍、NP 活性は 1.7 倍増大した。酸性、塩基性アミノ酸、アラニンなどを添加すると両酵素活性がさらに 10~50% 増大した。

- (3) DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーで、AP は完熟花粉では 3 種類、発芽花粉では 4 種類認め、NP はいずれにも 3 種類認めたが溶出パターンが異なっていた。

- (4) 分画酵素の最適 pH は AP では 3.0~3.5、NP ではすべて 6.0 で、最適温度は一般に 40~50 °C であった。pH 安定性については、両花粉とも AP は pH 5.0~7.0 で安定でこれよりアルカリ側で不安定となり、NP は pH 6.0~8.0 で安定で酸性側で不安定となるが、安定 pH をはずれた場合の失活程度は発芽花粉プロテイナーゼの方が著しかった。熱安定性については、完熟花粉の AP、NP は 80 °C で、発芽花粉の AP、NP は 70 °C で完全に失活した。

- (5) Mn²⁺はすべての AP 活性を増大 (36~160%) し、Cu²⁺は一部の AP 活性を若干増大 (10~18%) した。Zn²⁺は NP_3 と AP_3 を、Mg²⁺は AP_3 活性のみを増大 (それぞれ 30%、21%、15%) した。Hg²⁺はほとんどの酵素活性を阻害したが、Cu²⁺は NP 活性のみを阻害した。EDTA、 α -フェナンスロリン、PCMB、モノヨード酢酸、シアン化カリウムの影響はほとんどみられなかった (Table 2)。

文 献

- (1) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：日本農芸化学会誌 (農化), 42, 1 (1968)。
- (2) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：農化, 42, 8 (1968)。
- (3) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：農化, 42, 13 (1968)。
- (4) 勝又悌三・鈴木寿直・故斗ヶ沢宣久：花粉誌, 16, 29 (1975)。
- (5) 勝又悌三・江尻慎一郎・田村藤二郎・佐々木裕子：日本農芸化学会大会講演要旨集 p. 162 (1975)。
- (6) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三・太田達郎：農化, 41, 178 (1967)。

- (7) M. L. Anson: J. Gen. Physiol., 22, 79 (1938).
- (8) B. Hagihara: Ann. Rep. Sci. Works Fac. Sci. Osaka Univ., 2, 35 (1954).
- (9) 赤堀四郎編：酵素研究法 2, 朝倉, p. 241 (1956).
- (10) 東北パルプ K K 技術研究所、K K ミドリ十字中央研究所共編：イオン交換セルロースの使用手引書, 医学書房, p. 15 (1967).
- (11) O. Kamman: Beitr. Chem. Physiol. Path., 5, 346 (1904).
- (12) J. B. Paton: Am. J. Bot., 8, 471 (1921).
- (13) Y. Makinen and J. L. Brewbaker: Physiol. Plant, 20, 477 (1967).
- (14) A. D. Nevryanskaya and B. L. Dorokhov: Fotosin. Deyatel. Rast. Vliyanie Nee Miner. Pitan., 1970, 69; Chem. Abst., 75, 34606r (1971).
- (15) I. Simeonova and M. Spirova: Fiziol. Rast., 1974, 69; Chem. Abst., 83, 25067d (1975).
- (16) A. Hara, K. Matsugano and A. Kobayashi: Jap. J. Palyn., 15, 41 (1975).
- (17) K. Tanaka: Sci. Rep. Tōhoku Univ. 4th Ser. (Biology), 21, 185 (1955).
- (18) 岩波洋造：花粉学大要, 風間書房, p. 148 (1964).
- (19) A. N. Glazer and E. L. Smith: The Enzymes Ed. by P. D. Boyer, Academic Press New York and London, 3, 501 (1971).
- (20) S. Ejiri, M. Nunomiya and T. Katsumata : Agr. Biol. Chem., 40, 1127 (1976).

Summary

Proteinase in the pollen of *Pinus densiflora* was studied. The results obtained are as follows.

1. Two different proteinases were present in the crude extracts from the pollen, one having a pH optimum of 3.0 (acid proteinase, AP) and the other of 6.0 (neutral proteinase, NP).
2. During the germination of the pollen on sucrose-agar medium, both proteinase activities increased with the lapse of time, furthermore increased by the addition of acidic or basic amino acids or alanine.
3. By the elution with a linear concentration gradient of sodium chloride from a DEAE-cellulose column, the crude acid proteinase was separated into AP₁, AP₂ and AP₃ in the matured pollen, AP'₁, AP'₂, AP'₃ and AP'₄ in the germinated pollen, and the crude neutral proteinase into three neutral proteinases in the matured or germinated pollen as shown in Figs. 4 and 5.
4. The fractionated acid proteinases showed optimum activities at pH 3.0~3.5 and at 40~50°C, and were stable at the pH range of 5.0~7.0. The fractionated neutral proteinases showed optimum activities at pH 6.0 and at 45°C, and were stable at the pH range of 6.0~8.0. The activities of the fractionated proteinases were lost at 70°C within ten minutes in the germinated pollen, at 80°C in the matured pollen.
5. The enzymatic reactions of fractionated acid proteinases were promoted by Mn²⁺ and those of AP₁, AP₃ and AP'₃ by Cu²⁺ and those of NP₃ and AP'₃ by Zn²⁺ and that of AP'₃ by Mg²⁺. Hg²⁺ was inhibitory for almost all of the proteinases and Cu²⁺ for the neutral proteinases. Sulfhydryl reagents and chelating reagents had no effect on the activity as shown in Table 2.

Fig. 1. pH-activity curves of the crude proteinase.

Reaction mixture contained 1 ml of the water extracted enzyme solution and 1 ml of 1% hemoglobin (●—●, ○—○) or 2% casein (●.....●, ○.....○) dissolved in the following 0.1 M buffers: KCl-HCl buffer (pH 1.0~2.0), citrate-Na₂HPO₄ buffer (pH 2.5~5.5), phosphate buffer (pH 6.0~7.0), and NH₄OH-NH₄Cl buffer (pH 8.0~9.0). The experiments were carried out at 40°C for 30 min. The germination was carried out as shown in Table 1.

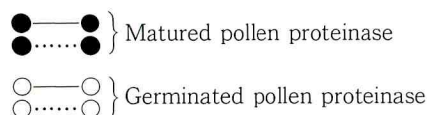
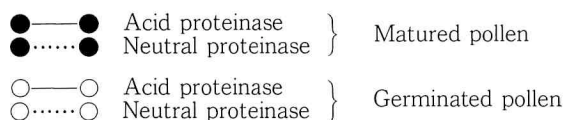


Fig. 2. Temperature-activity curves of the crude proteinase.

Reaction mixture contained 1 ml of the water extracted enzyme solution which was diluted with equal vol. of distilled water for acid proteinase, and 1 ml of 1% hemoglobin in 0.1 M citrate-Na₂HPO₄ buffer (pH 3.0) for acid proteinase or 2% casein in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) for neutral proteinase. The activities were measured after 30 min incubation.

Fig. 3. Activity of proteinase during the germination of the pollen of *Pinus densiflora*.

Reaction mixture was same as in Fig. 2 except the enzyme solution extracted with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) was used, and the activities were measured after 30 min incubation at pH 3.0 for acid proteinase or at pH 6.5 for neutral proteinase at 40 C.

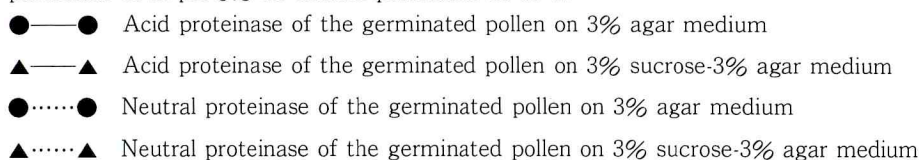


Fig. 4. Chromatography of the matured pollen proteinase on DEAE-cellulose.

Dialyzed ammonium sulfate fraction from the matured pollen was placed on a DEAE-cellulose column (1.8 × 28cm) equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0), and eluted with 100 ml of the same buffer, then eluted by a linear concentration gradient of NaCl at a flow rate of 0.3 g/min, collecting 5g fractions. The mixing chamber and reservoir contained 250 ml of the above-mentioned buffer and 250 ml of the same buffer with 0.5 M NaCl, respectively. The activities were measured same as in Fig. 3.

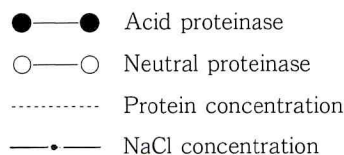


Fig. 5. Chromatography of the germinated pollen proteinase on DEAE-cellulose.

All procedures and symbols were same as in Fig. 4.

Fig. 6. pH-activity curves of the fractionated proteinase.

Reaction mixture contained 1 ml of the fractionated proteinase solution in which AP_1 fraction was diluted with equal vol. of distilled water and 1 ml of 1% hemoglobin (pH 2.5~5.0) or 2% casein (pH 6.0~7.0), and the activities were measured after 60 min incubation at 40°C.

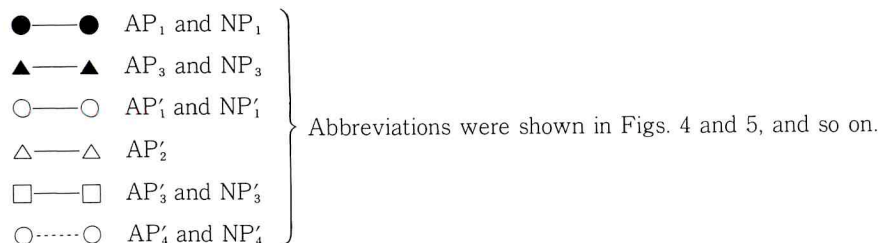


Fig. 7. Temperature-activity curves of the fractionated proteinase.

The enzyme solutions used were same as in Fig. 6, and the activities were measured after 60 min incubation at pH 3.0 for acid proteinase or pH 6.5 for neutral proteinase.

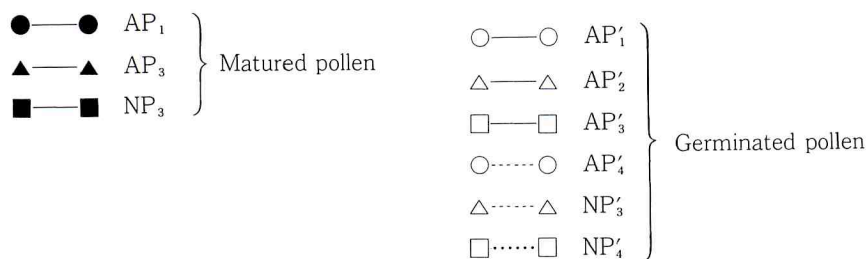


Fig. 8. pH-stability curves of the fractionated proteinase.

The residual activities were measured same as in Fig. 3 except incubation time was 60 min. See the text for experimental details.



Fig. 9. Thermal stability of the fractionated proteinase.

Symbols were same as in Fig. 8, and the residual activities were measured same as in Fig. 8. See the text for experimental details.

紹 介

中村 晋等編 図説アレルギークリニック（印刷中）

本書は現在第一線に活躍中のアレルギー医師の総力を結集してつくられる図説である。その総論 4 抗原・2) 吸入性抗原・ii) 花粉に花粉症に関する花粉図譜を上野が書いた。これには少しの説明を加えてあるが、その原本となったのは上野の害草手配書（花粉誌 6 1970）と害草手配書補遺（花粉誌 7 1971）である。花粉検定用の図譜の必要がさげばれている今日、幾瀬博士の名著「日本植物の花粉」が入手困難なので、Woclehouse などの画を引用して書いた図譜である。花粉症関係の人々の座右におかれることを願う。1976 年秋出版予定。（金原書店）